扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因的克隆、原核表达和不同发育阶段表达分析

罗　梅[#], 董章勇[#], 宾淑英, 廖泓之, 林进添[*]
(仲恺农业工程学院外来有害生物预警与控制研究所, 广州 510225)

摘要: 昆虫组织蛋白酶 B 在昆虫代谢过程中发挥重要作用。本研究利用 RACE 技术克隆了扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 组织蛋白酶 B 基因的开放阅读框(ORF)序列, 命名为 *PsCb* (GenBank 登录号: JQ727999)。生物信息学分析表明, 该基因的开放阅读框包含 927 bp 的片段, 编码 308 个氨基酸。多序列比对表明, 该基因编码的蛋白在 N 端变异较大, 在 C 端保守性高。组织蛋白酶 B 基因的系统进化树结果表明扶桑绵粉蚧组织蛋白酶独自成为一支。原核表达电泳检测到一条大约 35 kDa 的目的条带, 与预测的蛋白分子量相符。组织蛋白酶 B 基因在扶桑绵粉蚧各个虫态均有表达, 卵期表达量相对较低, 2 龄若虫期达到最高峰, 然后下降。本研究为进一步研究该基因的功能并开发出组织蛋白酶抑制剂, 从而研制出扶桑绵粉蚧杀卵剂和胚胎发育抑制剂等提供理论依据。

关键词: 扶桑绵粉蚧; 组织蛋白酶 B; 基因克隆; 原核表达; 基因表达谱
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2012)03-0276-08

Molecular cloning, prokaryotic expression and expression at different developmental stages of cathepsin B gene in mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)

LUO Mei[#], DONG Zhang-Yong[#], BIN Shu-Ying, LIAO Hong-Zhi, LIN Jin-Tian[*] (Institute for Management of Invasive Alien Species, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Cathepsin B plays an important role in insect metabolism. In this study, cathepsin B gene was cloned from mealybug *Phenacoccus solenopsis* and named as *PsCb* (GenBank accession no. JQ727999). This cDNA contains an open reading frame (ORF) which is 927 bp in length encoding 308 amino acids. Homology analysis shows that the N-terminal sequence of PsCB has larger variation, while the C-terminal sequence is conserved. Phylogenetic tree shows that PsCB is separated with other branches. Prokaryotic protein expression test showed the expressed product has the MW of 35 kDa, nearly equal to the predicted. Real-time PCR analysis revealed that *PsCb* mRNA was expressed in various developmental stages of *P. solenopsis*. The expression level was relatively lower at the egg stage, reached a peak at the 2nd instar nymph and then declined. Our study provides a theoretical basis for further study of the gene function, the development of cathepsin inhibitors as ovicides and inhibitors of embryonic development of *P. solenopsis*.

Key words: *Phenacoccus solenopsis*; cathepsin B; gene cloning; prokaryotic expression; gene expression profile

扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 1989 隶属半翅目, 粉蚧科, 绵粉蚧亚科, 绵粉蚧属 *Phenacoccus*。该虫原产北美洲, 最早发现于美国新墨西哥州一个公园里的两种杂草类植物根部的热带火蚁 *Solenopsis geminata* 巢中 (Tinsley, 1898; Cockerell, 1902), 随后逐步扩展至美国其他州以及南美洲、非洲、亚洲、欧洲和澳洲等地 (Williams and Granara de Willink, 1992; Kosztarab, 1996;

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201103026); 仲恺农业工程学院科研基金(G3100004)
作者简介: 罗梅, 女, 1984 年 5 月生, 广东韶关人, 硕士, 讲师, 主要从事入侵生物研究, E-mail: 08luomei@163.com;
董章勇, 男, 1981 年 4 月生, 广东化州人, 博士, 讲师, 主要从事分子生物学和蛋白组学研究, E-mail: dongzhangyong@hotmail.com
[#]共同第一作者 Authors with equal contribution
[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: linjtian@163.com
收稿日期 Received: 2011-12-30; 接受日期 Accepted: 2012-03-13

Williams，2004；Culik and Gullan，2005；Hodgson *et al*.，2008；Akintola and Ande，2008）。2008 年 6 月在我国广州园林植物扶桑上首次报道该虫（马骏等，2009；武三安和张润志，2009），随后 2009 年 3 月在海南三亚的扶桑上发现该虫的为害（徐卫等，2009），周湾等（2010）报道了 2009 年 9 – 11 月浙江省扶桑绵粉蚧的调查。研究者对其在中国的危害进行风险分析表明，该害虫在我国的风险危害性很大，尤其是长江中下游棉区和黄河中下游棉区危险性最大（王艳平等，2009）。2009 年 2 月，扶桑绵粉蚧正式被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》（农业部、国家质检总局第 1147 号公告）。扶桑绵粉蚧繁殖能力强，能危害棉花、扶桑、向日葵、南瓜、番茄等多种我国重要的经济作物。该虫无论对常规棉还是 Bt 棉均可产生严重危害。截至 2010 年 4 月 26 日扶桑绵粉蚧已在我国 9 个省（自治区）的局部地区发现，而且在江西九江永修进入棉田危害。孙峰和陆永跃（2011）研究表明扶桑绵粉蚧对棉花苗危害严重。

蛋白酶是催化蛋白质水解的所有酶类的总称，参与生命活动中多种生理、病理性反应。蛋白酶可分为内肽酶和外肽酶两类。根据作用位点的催化基团不同，又将内肽酶分为：半胱氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 B）、天冬氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 D）、丝氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 A）和金属蛋白酶四大类（Bond and Butler，1987；张志宏等，2000）。组织蛋白酶 B（cathepsin B，CB）易被巯基试剂抑制，可以降解血红蛋白、血清蛋白、卵黄磷蛋白、层粘蛋白、纤维连接蛋白和Ⅳ型胶原等细胞外基质成分，从而破坏一系列组织屏障（Berquin and Sloane，1996；杜欣军等，2004）。组织蛋白酶 B 广泛存在于细菌、病毒、原生动物、植物、昆虫和哺乳动物中。在昆虫中，Cho 等（1999）报道埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 卵中含有组织蛋白酶 B。徐夏莲等（2001）报道在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 成虫的脂肪体、卵巢、卵中均含有组织蛋白酶 B。赵艳艳等（2008）成功克隆了烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 组织蛋白酶 B 基因。昆虫组织蛋白酶 B 参与胚胎发育中卵黄蛋白降解，为胚胎发育提供必要的营养物质氨基酸。该蛋白的缺失会影响昆虫的正常代谢，甚至导致死亡。营养物质分解代谢在昆虫胚胎发育早期是其主要的生物化学过程之一，这一时期抑制卵内蛋白酶活性，可以终止其胚胎发育，进而杀灭虫卵。因此，研究组织蛋白酶 B 对于开发杀卵剂或胚胎发育抑制剂具有重要意义。本研究首次克隆了扶桑绵粉蚧的组织蛋白酶 B 基因的 cDNA 序列，进行了原核表达和组织蛋白 B 的纯化，并分析了该基因在不同虫态中的表达情况，为进一步研究该蛋白对扶桑绵粉蚧的生长发育及其代谢的影响提供了蛋白研究材料，并为开发研制组织蛋白酶抑制剂和扶桑绵粉蚧杀卵剂或胚胎发育抑制剂等提供技术基础。

1　材料与方法

1.1　材料和主要试剂

扶桑绵粉蚧为本实验室温室用扶桑植株培养。取扶桑绵粉蚧混合种群样品迅速放入液氮冷冻后保存于 –70℃冰箱备用。研究该基因在不同龄期的表达，根据朱艺勇等（2011）方法，将温室培养的扶桑绵粉蚧分别收集卵、1 龄若虫、2 龄若虫、刚蜕皮的 3 龄若虫及未交配的成熟雌虫 5 个虫态。

RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司，3′-RACE 和 5′-RACE 试剂盒购于 Invitrogen 公司，pMD18-T 克隆载体、M-MLV 酶、ExTaq DNA 聚合酶均购于 TaKaRa 公司，核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 TIANGEN 公司。

1.2　扶桑绵粉蚧总 RNA 的提取和反转录

按照 RNA 抽提试剂盒（Qiagen 公司）使用说明提取扶桑绵粉蚧的总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后，按照反转录系统说明书分别以 3′-CDS Primer A、5′-CDS Primer A（引物序列如表 1）为引物进行反转录获得第一链 cDNA，以此作为 PCR 模板进行 3′末端序列、5′末端序列的扩增。

1.3　引物设计与合成

根据 GenBank 登录的昆虫组织蛋白酶 B 氨基酸保守序列，设计 1 对简并引物（PF1 和 PR1）进行 PCR 扩增，用于克隆扶桑绵粉蚧的组织蛋白酶 B 基因的 cDNA 片段。根据 PCR 测序结果设计了 5′RACE（PsPR51、PsPR52 和 UPM、NUP）和 3′-RACE（PsP3 和 UPM 及 NUP）反应引物，分别用于基因的 5′端和 3′端扩增。再根据序列拼接结果设计了 1 对特异性引物（F1 和 R1）用于扩增扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因全长阅读框，引物在广州英骏生物技术有限公司合成，引物序列如表 1。

1.4　PCR 扩增与 RACE 反应

以合成的 cDNA 为模板，加入 10 ×ExTaq DNA 聚合酶反应缓冲液 5 μL（含 Mg^{2+}），正向和反向引

表 1 本研究中用于 PCR 和 RACE 反应的引物
Table 1 Primers used for PCR and RACE in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5′-3′)
PF1	TCASATTGWCGGTSACACCC
PR1	CTASASCTCTTAAWCCASGATGT
PsP51	CTTCTCCAACGTAAATAAGGACGG
PsP52	TGGTCGCGTTTCCTCCAAATAATGC
PsP3	GATTGACGGTCACACCCTGATT
F1	AACATGTCAATCATAGGCA
R2	AATTATTTTCCCACTTCAGG
RTCBF	TACGGACCAACTCCATCGTG
RTCBR	TGCCTCAACAGGACCATTG
EBamF	GGATCC ATGAATACAACATGGAAAGCGGA
EHindR	AAGCTTTCAATAACTGTTTTTATAAGCTG

下划线为酶切位点。The restriction enzyme sites are underlined.

物各 1 μL (10 mol/L), 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/μL), 加水至 50 μL, 混匀, 离心, 放入 PCR 仪扩增。

PCR 反应程序为: 94℃ 变性 3 min; 接着进行 35 个循环, 循环条件为 94℃ 30 s, 50℃ 45 s, 72℃ 1 min。循环完毕后, 72℃ 保温 10 min。

RACE 反应参照试剂盒说明书。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段。

1.5 PCR 和 RACE 产物克隆、鉴定及序列测定

RACE 产物经电泳回收纯化后, 将回收产物连接至 pMD18-T 克隆载体后转化到感受态大肠杆菌 *Eschrichia coli* DH5α 中, 经蓝白斑和氨苄筛选, 重组质粒经扩大培养, 提取质粒 DNA 用于检测。测序工作由广州英骏生物技术有限公司完成。

1.6 基因和蛋白的序列分析

利用 Blast 在 NCBI 网站进行序列相似性比对分析; 在 NCBI 上的 ORF Finder(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)上进行 ORF 预测。蛋白翻译和基序分析及其理化性质预测采用蛋白组学在线 ExPASy (http://expasy.org/tools/protparam.html), 跨膜预测采用 TMPRED 在(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)及 TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0)在线预测。利用 Clustal W 在线工具(http://www.ebi.ac.uk/clustalw2)及 Clustal X 2.1 进行同源性分析和多序列比对。

采用 Clustal X 2.1 进行多序列比对后, 利用 MEGA4.1 软件中的 Neighbor-Joining 方法, 5 000 次重复构建分子系统进化树, 用于系统进化分析。

1.7 扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因的原核表达

用引物 EBamF(含 *Bam*H Ⅰ 酶切位点)和 EHindR(含 *Hind* Ⅲ 酶切位点)(引物序列见表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物插入 pET28a 载体, 构建重组表达质粒 pET28a-*PsCB*。重组质粒转化感受态细胞 BL21 (DE3)后, 涂板挑单克隆检测。将阳性克隆在 LB/Amp 培养基中于 37℃ 培养至 OD_{600} 为 0.6 ~ 1.0 时, 加入 IPTG 至 1 mmol/L进行诱导表达。抽提菌体蛋白后, 用 15% SDS-PAGE 电泳检测。蛋白纯化采用 QIAGEN 的 Ni-NTA 纯化试剂盒进行纯化。

1.8 扶桑绵粉蚧不同虫态组织蛋白酶 B 基因的表达分析

本研究筛选获得符合要求的特异性引物 RTCBF 和 RTCBR 用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。同时本研究以 *Actin* 基因作为内参基因。荧光定量所用引物序列见表 1。

荧光定量 PCR 采用 25 μL 体系, 各反应成分的含量为 12.5 μL SYBR 预混液, 10 μmol/L 的上、下游引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, 灭菌超纯水 9.5 μL, 混匀, 离心, 分到 8 连 PCR 管, 每个样品重复 3 次。放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 接着进行 40 个循环, 每个循环采用两步法: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min; 1 个循环的解离: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。使用仪器为 Bio-Rad 公司的 iQ5。反应结束后收集 C_T 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析(Livak and Schmittgen, 2001)。

1.9 数据统计与分析

所有试验数据采用 DPS 进行单因素方差分析(ANOVA)进行分析, 显著性测定采用邓肯氏新复极差法检验, 显著性检验水平为 $P<0.01$。

2 结果与分析

2.1 扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

以扶桑绵粉蚧的 cDNA 为模板, 以简并引物(PF1 和 PR1)进行扩增后得到 250 bp 左右的特异条带, 通过胶回收后连接到 pMD18-T 载体上并进行测序。将所得序列在 NCBI 核酸库中进行 Blast 分析, 结果发现该序列与其他昆虫的组织蛋白酶 B 基因的相似性最高, 推测所获得的片段是扶桑绵粉

蚧组织蛋白酶 B cDNA 片段的一部分。根据所得的 cDNA 部分片段设计特异引物(PsPR51，PsPR52 和 PsP3)分别进行基因 5′端和 3′端序列的扩增，测序拼接后得到扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因的 cDNA 全长序列。为验证以上 PCR，3′-RACE 和 5′-RACE 片段是来源于同一个基因，本研究设计了 1 对特异性引物(F1 和 R1)，PCR 扩增得到了一条约 1 000 bp 的特异性条带，测序结果与拼接序列一致。通过 NCBI 上的 ORF Finder 分析，该基因的开放阅读框包含 927 bp 的片段，编码 308 个氨基酸。用 Protparam 工具对该基因编码的蛋白进行预测，其分子质量为 35.1 kD；理论等电点为 6.13；分子式为 $C_{1563}H_{2314}N_{426}O_{459}S_{21}$，共有 4 783 个原子组成；稳定系数为 41.32，推测该蛋白的存在方式为不稳定的。利用 TMHMM-2.0 和 TMPRED 预测该蛋白可能没有跨膜区域。

2.2　扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 的结构预测与序列比对

用在线网站(http://scratch.proteomics.ics.uci.edu)对该蛋白的二级结构进行预测。308 个氨基酸组成的扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 由 2 个结构域(domain)组成，domain 1 为 1～166 个氨基酸，domain 2 为 167～308 个氨基酸。具有 3 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site)(N34，N58，N199)。

通过与其他 6 种昆虫的组织蛋白酶 B 序列比对可知(图 1)，该蛋白在 N 端序列表现出较大的变异，而在 C 端的保守性较高。即结构域 1 变异性较大，而结构域 2 的保守性较高。

2.3　组织蛋白酶 B 的分子系统进化

分子系统进化分析结果表明(图 2)，通过比对，与扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 相似性较高的大多数是昆虫及水生动物。选取 20 个组织蛋白酶 B 蛋白序列构建进化树，以人的作为外类群。从进化树看，双翅目与半翅目首先聚为一支，然后再与鳞翅目聚为一支，寄螨目为一支，水生动物为一支，而扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 单独聚为一支，并没有与半翅目的其他种聚在一起。

2.4　扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 的原核表达

抽提重组菌及质粒菌株的蛋白在 15% SDS-PAGE 电泳，结果发现重组菌在 35 kD 左右有明显的特异条带产生，而未插入目的基因的空质粒在相应位置未出现特异性条带(图 4)。从图 4 可看出，随着时间的递增，蛋白的表达浓度增大。从图 5 可看到表达纯化的扶桑绵粉蚧的特异性组织蛋白酶 B 蛋白。我们预测的分子质量为 35.1 kD，这与表达的结果一致，证明融合蛋白得到了有效表达并得到有效的纯化分离。

2.5　不同龄期组织蛋白酶 B 的表达

以扶桑绵粉蚧雌成虫的 mRNA 含量作为基准含量，对昆虫不同虫态的 mRNA 含量进行分析(图 5)，由图 5 可知 *PsCB* mRNA 在扶桑绵粉蚧的不同虫态中都有表达，但在 2 龄若虫中的表达量最高。*PsCB* mRNA 在 2 龄若虫中的含量是其成熟雌虫的 4.22 倍；1 龄若虫与 3 龄若虫的表达量相当，是成熟雌虫的 1.1 倍左右。*PsCB* mRNA 在卵期的表达量最低，是其成熟雌虫的 0.37 倍。

3　讨论

本研究首次克隆了扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 基因，命名为 *PsCb*。该基因的开放阅读框包含 927 bp 的片段，编码 308 个氨基酸。关于昆虫蛋白酶基因的研究相对较少，仅在少数的昆虫中有所报道。Xu 和 Kawasaki(2001)克隆了家蚕组织蛋白酶 B 基因；杜欣军等(2004)对棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原做了大量的研究；赵艳艳等(2008)从烟夜蛾卵巢中成功克隆出了含有完整 ORF 的组织蛋白酶 B 酶原基因 cDNA 片段。通过与其他 6 种昆虫的组织蛋白酶 B 序列比对可知，该蛋白在 N 端序列表现出较大的变异，而在 C 端的保守性较高。从构建的组织蛋白酶 B 基因的分子进化树来看，PsCB 单独具为一支。此结果说明，该基因的保守性不是绝对的，这可能是由于昆虫不同目之间有一定差异造成的，也有可能组织蛋白酶基因为家族基因，*PsCb* 可能与现有的家族有所差别。

本研究表明，该基因在扶桑绵粉蚧发育的各个阶段均有表达，卵期的表达相对较低，随后在发育过程中逐渐增加，到 2 龄若虫达到高峰，随后又下降。杨晓梅等(2005)分析了组织蛋白酶 B(HCB)在棉铃虫个体发育的表达，HCB 的表达和活性随着胚胎发育的进行逐渐下降；整个若虫阶段都没有 HCB 的表达和活性；整个蛹和成虫阶段虽然都有 HCB 的表达，但 HCB 的活性只能在发育晚期的蛹和成虫组织中检测到。这与本研究有所差异。杨晓梅等(2005)采用了原位水解电泳、免疫印迹和免疫组织化学等方法进行研究，该方法检测的是蛋白的含量，且灵敏度相对较低。而本研究采用了实时荧光 PCR 的方法来检测基因的表达水平，灵敏度高。

```
Culex quinquefasciatus        -----------  MRYLLLVAALAVASVAAKGVRISPLSGKFI DQI NAKATTWRAGRNFHPD  49
Helicoverpa armigera          ----------  MAASRATFVALVCALALAAADVQN-PLSDDFI NLI NTKQNSWKAGRNFPEH  50
Acyrthosiphon pisum           ---- MFKSIIFALV  GLLIF SFGRVDGATVRVDLNPLSDEFI DHI NSI QYYWSAGRNFHKD  56
Diabrotica virgifera          --------------  MDIV THSS --- DEVTNSKELHPLSDEFI NSI NAAKST WTAGRNFAQD  44
Drosophila grimshawi          ----------  MKFLIA TVSLLALVAMTKATESEPHMLSDEFI ELVKSKATT WTPGRNFDAA  51
Periplaneta americana         MASYEYLLLTAMLLFSCMQFTSS VPPPEPSVLVDPLSDDFI DHI NSLNTTWKAHRNFGND  60
Phenacoccus solenopsis        ---------------------------------------------        MNTTWKADYNI DSY  14
                                                                                   * .     *:

Culex quinquefasciatus        TPMSYI RGLMGVHKDADKF--- MPPVMLHDLDEGDDLPENFDAREQWPNCPTI REI RDQG  106
Helicoverpa armigera          TPFAHI KRLAGVLPDYHLS--- KLSKVEHEDELIA SLPENFDPRDKWPNCPTLNEVRDQG  107
Acyrthosiphon pisum           TPI SYI KGLMGVHEKNAEYP-- KLEQLLTYNDAST DLPETFDARERWPNCPTI REVRDQG  114
Diabrotica virgifera          KSMDYII  KLMGVLPDHKNY---- MPPVLTHKLEALEIPA DFDARQQWPHCPTI REI RDQG  100
Drosophila grimshawi          VSEHHI RALMGVHPDSHKFTLPEKRELLGADGEDKDLPEEFDSS KNWPNCPTI REI RDQG  111
Periplaneta americana         IPL  REI KKLMGVRRSLENFR---- LPEKSMEDI DI EIP EEFDPREQWPECPTLKEI RDQG  116
Phenacoccus solenopsis        I DNRFLGMMGI NYSELKPNVTPDLEPPFVVSKI SENLPDEFDSRVRWPNCPTI REI RDQG  74
                                 :    :      .                           .   .:*  **. .**.***:.*:****

Culex quinquefasciatus        SCGSC WAFGAVEAMSDRI CI HSKGKVHFRVSAEDLVSCCHTCGFGCNGGFPGAAWSYWVR  166
Helicoverpa armigera          SCGSC WAFGAVEAMTDRYCTYSNGTQHFHFSAEDLLSCCPI CGLGCNGGMPTLAWEYWKH  167
Acyrthosiphon pisum           SCGSC WAFGAVEAMSDRVCI HSNGTKNFHFSAENLVSCCWTCGFGCNGGFPGAAWNYWKT  174
Diabrotica virgifera          SCGSC WAFGAVEAMSDRVCI HSNGESNFHFSS DDLVSCCWTCGMGCNGGYPGAAWHYWVR  160
Drosophila grimshawi          SCGSC WAFGAVEAMSDRVCI HSNATVNFHFSADDLVTCCHTCGFGCNGGFPGAAWSYWTT  171
Periplaneta americana         SCGSC WAFGAVEAMSDRVCI HSKGKTHFHFSAEDLLTCCSSCG FGCNGGEPGAAWDYWVS  176
Phenacoccus solenopsis        SCGACWAFAAAEAMSDRVCI HSSQT KHFHFSALNLLSCCDSCEKGCLGCDHHLAWDHWVK  134
                              ***:****.*.***:** *:*.          :*:.*:  :*: :**   *   ***      **  :*

Culex quinquefasciatus        KGLVSGGPYGSDQGCQPYAI SPCEHHVNGTRGPCNGE-GKTPKCVKKCQASYNVPYAKDK  225
Helicoverpa armigera          FGLVSGGSYNSSQGC RPYEIPP CEHHVPGNRMPCNGD-SKTPKCEKTCESNYNVDYRKDK  226
Acyrthosiphon pisum           KGIV SGGPYGSNMGCIP YEIAP CEHHVNGTRGPCKEG-GKTPTCVKKCEEGYKVPYAQDL  233
Diabrotica virgifera          KGLVSGGQYGTKQGCRPYEIPP CEHHTNGSRPACDASEGNTPKCAKSCESNYKI NYSNDL  220
Drosophila grimshawi          RGIV SGGSYNST EGCRPYEVEPCEHHVDGPRPPCHSG--ST PHCKHQCQPNYSVDYEKDK  229
Periplaneta americana         TGIV SGGSYNSHQGCQPYAI EPCEHHVNGTRKPCGEG--DTPRCVKRCEEGYDVPYGKDR  234
Phenacoccus solenopsis        HGIV SGGSYGS KEGCQPYHLPP CEHHRAGPRRNCTKY-GPTPSCARVCQPDYKI SYEDDL  193
                              *:***** *.:  ** ** :***** * *  *     *** :*: .*.: * .*

Culex quinquefasciatus        FFGKSSYS IA -SHEQQI QKELFTNGPVEGAFTVYEDLLNYKEGVYQHTAGKMLGGHAI RI  284
Helicoverpa armigera          RYGKHVFSVS-SKEDHI RAELFKNGPVEGAFTVYSDLLNYKTGVYKHTI GDALGGHAVKI  285
Acyrthosiphon pisum           HHGKSAYSI R-NDVDQI RQEI YTNGPVEGAFTVYEDFIA YRAGVYKHVAGKALGGHAI RI  292
Diabrotica virgifera          HFGSKAYSI S-SDVKQI QAEIL QNGPVEGAFSVYADFVNYKTGVYQHI KGQFLGGHAI RI  279
Drosophila grimshawi          HFGASSYS I N-RNPRNI QREIMTNGPVEGAFTVYEDLIL YKTGVYQHVHGKQLGGHAI RI  288
Periplaneta americana         HFGKSAYAVP-GSVKAI QKELLLNGPAEAALTVYDDFLHYRTGVYQHVSGGALGGHAVRL  293
Phenacoccus solenopsis        HFGKQWYALAPHNEKII  RTEIF HNGPVEATMAAYEDFYTYESGI YHHI EGTFVCDHAVKI  253
                               .*  :::      *: *: ***.*.::::.* *:  *.  *:*:*  *  : .**:::

Culex quinquefasciatus        LGWGVEN--DTKFWLIANSWNSDWGDNGYFKIL RGSDHLGI ESS IAA GLPKV----  334
Helicoverpa armigera          LGWGVEN--GNKYWLIANSWNSDWGDNGFFKIL RGEDHCGI ESS IVA GEPMFVEY-  338
Acyrthosiphon pisum           LGWGVQNG-EIP YWLVANSWNTDWGSDGFFKIL RGSDECGI EGQI NAGLPA-----  342
Diabrotica virgifera          FGWGVEN--NTPYWLIANSWNTDWGDSGTFKIL RGSDHCGI ESGIVA GLPK-----  328
Drosophila grimshawi          I GWGVWGESKVPYWLIANSWNTDWGDNGFFRIL RGKDHCGI ESQI SAGLPKL----  340
Periplaneta americana         LGWGVED--GTPYWLLANSWNYDWGDNGYFRIL RGQDECGI ESDI NGGLPKV----  343
Phenacoccus solenopsis        I GWGTDKKTNTPYWLVANSFNTDWGEYGFFKI KRGVNECGI ENKI TAGIPAYKNSY  309
                               :***.        :**:***:* ***.  * *:* ** :.  ***.  * .* *
```

图 1 PsCB 氨基酸序列与其他昆虫 CBs 的同源性比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of PsCB with the known CBs from other insects

序列的登录号 GenBank accession numbers of cathepsin B sequences：豆无网长管蚜 *Acyrthosiphon pisum*：NP_001119608；玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera*：CAE47498；果蝇 *Drosophila grimshawi*：XP_001995463；美洲大蠊 *Periplaneta americana*：AAW28820；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*：XP_001842337；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*：AAF35867.2；扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*.

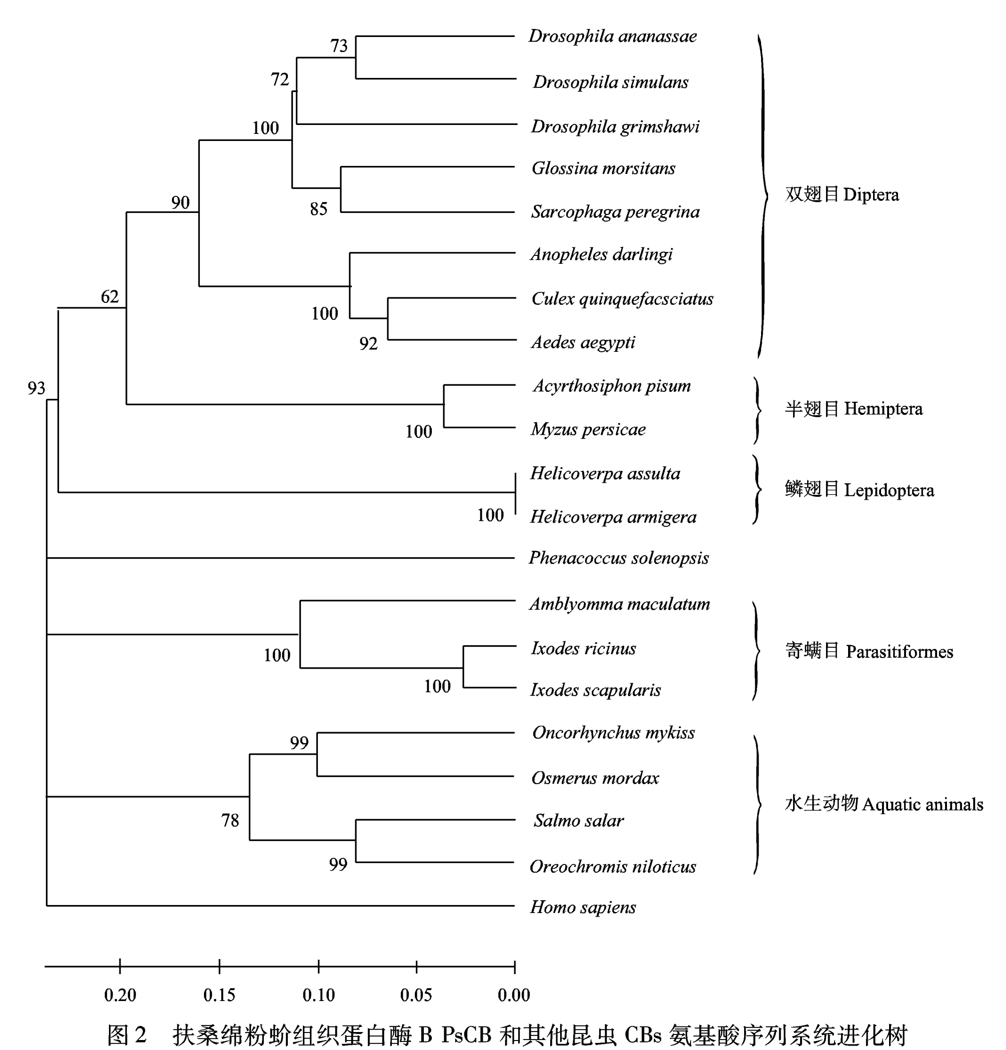


图 2　扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B PsCB 和其他昆虫 CBs 氨基酸序列系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of amino acid sequences of PsCB from *Phenacoccus solenopsis* and the known CBs from other insects

所分析的各物种组织蛋白酶 B 基因 cDNA 序列来源及 GenBank 登录号 GenBank accession numbers related to the species analyzed：扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*（JQ727999）；虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*（NP_001117776）；胡瓜鱼 *Osmerus mordax*（ACO10136）；豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*（NP_001119608.1）；蓖子硬蜱 *Ixodes ricinus*（ABO26563.1）；桃蚜 *Myzus persicae*（DAA06112.1）；果蝇 *Drosophila grimshawi*（XP_001995463.1）；肩突硬蜱 *Ixodes scapularis*（XP_002404475.1）；嗜凤梨果蝇 *Drosophila ananassae*（XP_001965553.1）；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（XP_001842337.1）；大西洋鲑 *Salmo salar*（ACN10219.1）；刺舌蝇 *Glossina morsitans*（ADD20462.1）；斑点钝眼蜱 *Amblyomma maculatum*（AEO35153.1）；尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus*（XP_003454569.1）；拟果蝇 *Drosophila simulans*（XP_002106884.1）；埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XP_001653890.1）；达林按蚊 *Anopheles darlingi*（EFR22198.1）；棕尾别麻蝇 *Sarcophaga peregrina*（BAA04103.1）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（AAF35867.2）；烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（ABM05925.1）；人 *Homo sapiens*（AAH10240）. 分支上数值为 bootstrap 值和图下方标尺为进化距离。Values on the branch are bootstrap values of 5 000 replications, and the ruler below the map is evolutionary distance.

研究均表明组织蛋白酶 B 与虫体的个体发育有着密切的关系。

由于组织蛋白酶 B 参与许多重要的生命活动，如肿瘤转移（Keppler and Slane, 1996）及细胞凋亡（Isahara *et al.*, 1999）等，国际上对人、哺乳动物及水生动物的组织蛋白酶 B 的研究报道较多。在诊断及治疗恶性肿瘤的研究中，组织蛋白酶 B 也将成为新的研究热点，有可能被开发成新型蛋白酶资源。Nagao 等（2000）合成了一些对组织蛋白酶 B 有活性的吡咯酮类物质，如化合物 3 在 1×10^{-7} mol/L 浓度时，即可抑制90.7%组织蛋白酶 B 的活性。于小华等（2005）研究表明组织蛋白酶 B 抑制剂 CA-074Me 通过抑制 cathepsin B 的表达，减轻心肌损害，提高感染小鼠的存活率，对 Balb/c 小鼠 CVB3 心肌炎具有良好的治疗作用。昆虫蛋白酶抑制剂的开发和利用在害虫生物防治领域将会有很大的发展前景。原核表达是目前非常成熟的异源表达系统，应用该系统能够有效地研究虫体内表达量较低蛋白

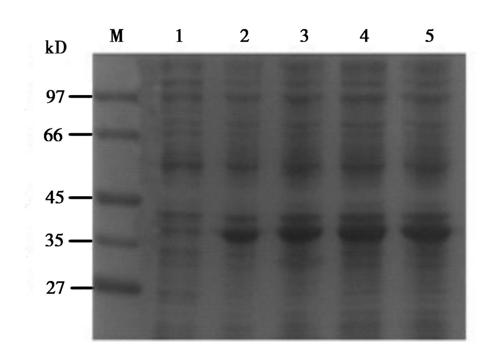


图3 扶桑绵粉蚧重组蛋白 pET28a-CB 不同诱导时间的表达
Fig. 3 The expression of pET28a-CB at different induction time
M: Protein molecular weight marker; 1: pET28a-空载体诱导产物 Expression product of pET28a; 2: pET28a-CB 诱导 1 h 产物 Expression product of pET28a-CB at 1 h after IPTG induction; 3: pET28a-CB 诱导 2 h 产物 Expression product of pET28a-CB at 2 h after IPTG induction; 4: pET28a-CB 诱导 4 h 产物 Expression product of pET28a-CB at 4 h after IPTG induction; 5: pET28a-CB 诱导 8 h 产物 Expression product of pET28a-CB at 8 h after IPTG induction.

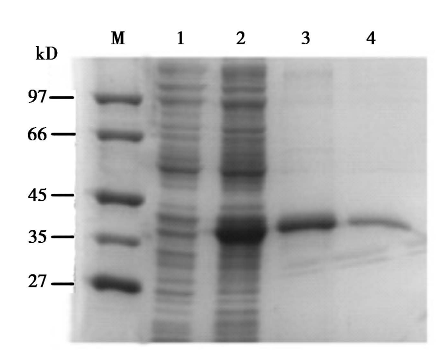


图4 扶桑绵粉蚧重组蛋白 pET28a-CB 纯化的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed product of pET28a-CB
M: Protein molecular weight marker; 1: pET28a-空载体诱导 Expression product of pET28a; 2: pET28a-CB 纯化前产物 Expression product of pET28a-CB before purification; 3: pET28a-CB 纯化后稀释 10 倍产物 Purified and 10-fold diluted product of pET28a-CB; 4: pET28a-CB 纯化后稀释 50 倍产物 Purified and 50-fold diluted product of pET28a-CB.

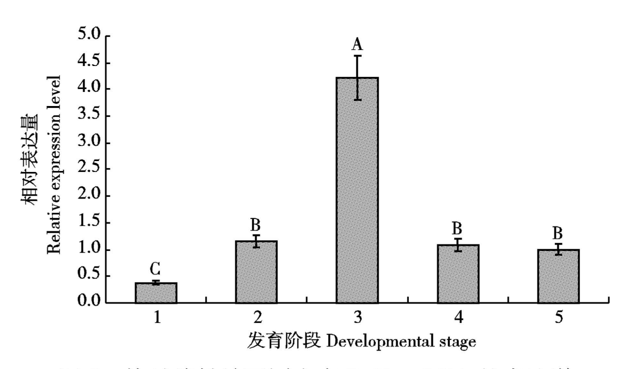


图5 扶桑绵粉蚧不同虫态 PsCB mRNA 的表达谱
Fig. 5 Relative expression level of the PsCB mRNA in *Phenacoccus solenopsis* at different developmental stages
1: 卵 Egg; 2: 1 龄若虫 1st instar nymph; 3: 2 龄若虫 2nd instar nymph; 4: 3 龄若虫 3rd instar nymph; 5: 成熟雌虫 Mature female. 图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上不同大写字母代表差异性极显著 ($P<0.01$)。Values are mean ± *SE*; different capital letters above bars indicate significant difference ($P<0.01$).

的功能。本研究将扶桑绵粉蚧组织蛋白酶 B 成功进行体外表达与纯化，下一步将研究该表达纯化所得的蛋白对扶桑绵粉蚧的生长发育及其代谢的影响，为研制扶桑绵粉蚧抑制剂提供技术基础，也为规模化生产扶桑绵粉蚧抑制剂提供理论参考。

参考文献 (References)

Akintola AJ, Ande AT, 2008. First record of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) on *Hibiscus rosa-sinensis* in Nigeria. *Agric. J.*, 3(1): 1-3.

Berquin IM, Sloane BF, 1996. Cathepsin B expression in human tumors. *J. Adv. Exp. Med. Biol.*, 389: 281-294.

Bond JS, Butler PE, 1987. Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 333-364.

Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS, 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.*, 274: 13311-13321.

Cockerell TDA, 1902. Two new mealybugs from New Mexico. *Can. Entomol.*, 34(2): 315-316.

Culik MP, Gullan PJ, 2005. A new pest of tomato and other records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Espírito Santo, Brazil. *Zootaxa*, 964: 1-8.

Du XJ, Shao HL, Shao DD, Zhao XF, Wang JX, 2004. Expression and purification of procathepsin B from *Helicoverpa armigera* in *Escherichia coli*. *J. Agric. Biotechnol.*, 12(2): 162-166. [杜欣军, 邵红莲, 邵丁丁, 赵小凡, 王金星, 2004. 棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原在大肠杆菌中的表达及纯化. 农业生物技术学报, 12(2): 162-166]

Hodgson C, Abbas G, Arief MJ, Saeed S, Karar H, 2008. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae), an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India, with a discussion on seasonal morphological variation. *Zootaxa*, 1913: 1-35.

Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S. 1999. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*. 91: 233-349.

Keppler D, Slane BF, 1996. Cathepsin B: multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. *Enzyme Protein*, 49: 94-105.

Kosztarab M, 1996. Scale Insects of Northeastern North America: Identification, Biology, and Distribution. Virginia Museum of Natural History, Martinsville, Virginia. 499-501.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

Methods, 25(4): 402 - 408.

Ma J, Hu XN, Liu HJ, Liang F, Zhao JP, Feng LX, Chen NZ, 2009. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley was found on Chinese hibiscus *Hibiscus rosa-sinensis* in Guangzhou. *Plant Quarantine*, 23(2): 35 - 36. [马骏，胡学难，刘海军，梁帆，赵菊鹏，冯黎霞，陈乃中，2009. 广州扶桑上发现扶桑绵粉蚧. 植物检疫，23(2): 35 - 36]

Nagao Y, Sano S, Morimoto K, Kakegawa H, Takatani T, Shiro M, Katunuma N, 2000. Synthesis of a new class of cathepsin B inhibitors exploiting a unique reaction cascade. *Tetrahedron Lett.*, 41: 2419 - 2424.

Sun F, Lu YY, 2011. A new invasive mealybug, *Phenacoccus solenopsis*, could cause serious damage to cotton plant. *China Cotton*, (2): 19 - 20. [孙峰，陆永跃，2011. 新入侵害虫扶桑绵粉蚧严重危害棉花. 中国棉花，(2): 19 - 20]

Tinsley JD, 1989. Notes on Coccidae, with descriptions of new species. *Canadian Entomologist*, 30: 317 - 320.

Wang YP, Wu SA, Zhang RZ, 2009. Pestrisk analysis of a new invasive pest, *Phenacoccus solenopsis*, to China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1): 101 - 106. [王艳平，武三安，张润志，2009. 入侵害虫扶桑绵粉蚧在中国的风险分析. 昆虫知识，46(1): 101 - 106]

Williams DJ, 2004. Mealybugs of Southern Asia. The Natural History Museum, London. 896 pp.

Williams DJ, Granara de Willink MC, 1992. Mealybugs of Central and SouthAmerica. CAB International, Wallingford, UK. 635 pp.

Wu SA, Zhang RZ, 2009. A new invasive pest, *Phenacoccus solenopsis*, threatening seriously to cotton production. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1): 159 - 162. [武三安，张润志，2009. 威胁棉花生产的外来入侵新害虫———扶桑绵粉蚧. 昆虫知识，46(1): 159 - 162]

Xu W, Fu HB, Long QH, Jiang LR, Zhao G, Zou XW, Han YC, 2009. The pest *Phenacoccus hibiscus* was found in Hainan Province. *Plant Quarantine*, 5(23): 33. [徐卫，付海滨，龙琼华，蒋林蓉，赵刚，邹细万，韩玉春，2009. 海南省发现有害生物——扶桑绵粉蚧. 植物检疫，5(23): 33]

Xu XL, Zhao XF, Wang JX, 2001. Distribution and biosynthesis sites of cathepsin B in *Helicoverpa armigera*. *Zoological Research*, 22(3): 242 - 245. [徐夏莲，赵小凡，王金星，2001. 棉铃虫组织蛋白酶 B 组织分布与合成部位的研究. 动物学研究，22(3): 242 - 245]

Xu YS, Kawasaki H, 2001. Isolation and expression of cathepsin B cDNA in hemocytes during metamorphosis of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 130: 393 - 399.

Yang XM, Hou LJ, Dong DJ, Wang JX, Zhao XF, 2005. Expression and variations in activity of cathepsin B-like proteinase during the ontogenetic process of the cotton boll worm: *Helicoverpa armigera*. *Journal of Shandong University*, 40(5): 119 - 124. [杨晓梅，侯立静，董杜鹃，王金星，赵小凡，2005. 组织蛋白酶 B 在棉铃虫个体发育过程中的表达及活性研究. 山东大学学报(理学版)，40(5): 119 - 124]

Yu XH, Zhang XG, Wang SJ, Chen RZ, Yang YZ, Li SJ, 2005. Effects of cathepsin B inhibitor CA_074Me on viral myocarditis in mice. *Journal of Clinical Pediatrics*, 23(1): 52 - 59. [于小华，张新刚，王时俊，陈瑞珍，杨英珍，李双杰，2005. 组织蛋白酶 B 抑制剂 CA-074Me 对小鼠病毒性心肌炎的干预作用. 临床儿科杂志，23(1): 52 - 59]

Zhang ZH, Zhao XF, Wang JX, 2000. Research on proteinases in eggs of insects. *Entomol. Knowl.*, 37(4): 247 - 250. [张志宏，赵小凡，王金星，2000. 昆虫卵内蛋白酶的研究. 昆虫知识，37(4): 247 - 250]

Zhao YY, Liu JB, Luo MH, Guo XR, Yuan GH, 2008. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of cathepsin B gene from *Helicoverpa assulta* (Guenee) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(11): 1121 - 1128. [赵艳艳，刘建兵，罗梅浩，郭线茹，原国辉，2008. 烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原基因的克隆、序列分析和原核表达. 昆虫学报，51(11): 1121 - 1128]

Zhou W, Lin YB, Xu FX, Yan T, Wang XH, Liang XH, Shi ZH, 2010. Investigation of distribution and damage of *Phenacoccus solenopsis* in Zhejiang Province. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(6): 1231 - 1235. [周湾，林云彪，许凤仙，严铁，王秀华，梁仙和，施祖华，2010. 浙江省扶桑绵粉蚧分布危害调查. 昆虫知识，47(6): 1231 - 1235]

Zhu YY, Huang F, Lu YB, 2011. Bionomics of mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) on cotton. *Acta Entomologica Sinica*, 54(2): 246 - 252. [朱艺勇，黄芳，吕要斌，2011. 扶桑绵粉蚧生物学特性研究. 昆虫学报，54(2): 246 - 252]

（责任编辑：赵利辉）